

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07J 71/00

A61K 31/70 A61P 9/10

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00135190.7

[43] 公开日 2002 年 7 月 31 日

[11] 公开号 CN 1361111A

[22] 申请日 2000.12.27 [21] 申请号 00135190.7

[71] 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 200031 上海市太原路 294 号

[72] 发明人 朱大元 顾仁樾 蒋山好

曾佳锋 蒋福祥 刘传海

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 费开遼

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 呋甾皂甙的类似物、分离方法和用途

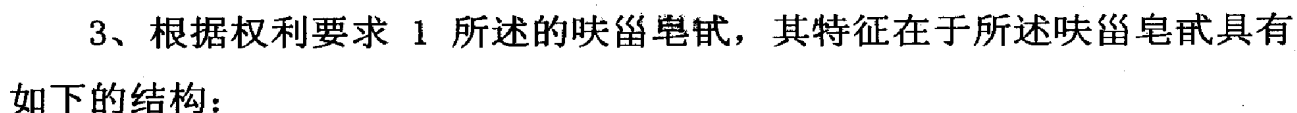
[57] 摘要

本发明提供一类从白蒺藜中分离得到 5 个呋甾皂甙化合物,它们经药 理试验及药效试验证明它们对动物实验性抗缺血性脑梗塞和抗心肌梗塞具 有明显的预防和治疗作用。

ISSN 1008-4274

The diagram shows a steroid molecule with four fused rings (three six-membered and one five-membered). Substituents are indicated as follows: R_2O is attached to the first six-membered ring; R_3 is attached to the second six-membered ring; a five-membered ring is fused to the third six-membered ring, with an OR' group attached to it; and a side chain is attached to the five-membered ring, ending in an R_1O group. Stereochemistry is indicated with wedged bonds for the methyl groups at the ring junctions and a dashed bond for the OR' group.

$$R' = H$$



7、一类如上所述的呋甾皂甙的制备方法，其特征在于采用水热提大孔树脂法，它的步骤如下：

- a. 由蒺藜全草磨粉用水煮沸提取二次，过滤，沉渣再用 H_2O 热提三次，过滤，残渣丢弃，合并水提取液；
 - b. 上述水提液 $5-10^{\circ}C$ 放置 10-15 小时，过滤；
 - c. 滤液通大孔树脂，提取液通过后再用水洗直至洗脱液呈无色，水洗脱液丢弃，再用 60%-70% 乙醇洗脱至无皂甙反应；
 - d. 减压蒸留除去 60%-70% 乙醇洗脱液至浓缩液比重 1.37-1.40；
 - e. 上述所得浓缩液加入乙醇， $5-10^{\circ}C$ 放置 10-15 小时；
 - f. 上述溶液过滤除去滤渣，滤液减压浓缩，得到浸胶，上柱；
 - g. 用氯仿冲洗，再用氯仿：甲醇梯度洗脱冲洗，合并有效成分，减压浓缩得产品；
 - h. 粗产品用不同比例的硅胶进行柱层析，分别可分得 6 个呋甾皂甙。
8. 根据权利要求 7 所述的呋甾皂甙的制备方法，其特征在于所述步骤 C 采用的大孔树脂为苯乙烯非极性吸附大孔树脂。
9. 根据权利要求 7 所述的呋甾皂甙的制备方法，其特征在于所述步骤 g 氯仿：甲醇梯度洗脱为 85%-65% ： 15%-35%。
10. 一类如上所述的呋甾皂甙在治疗抗缺血性脑梗塞药物中应用。
11. 一类如上所述的呋甾皂甙在治疗心肌梗塞药物中应用。

说明书

呋甾皂甙的类似物、分离方法和用途

本发明涉及植物中有效成份提取，更具体地说是白蒺藜植物有效成份的提取及在心血管疾病药物中的应用。

白蒺藜(*Tribulus terrestris* L.)系蒺藜科(*Zygophyllaceae*)植物。该药具有平肝潜阳、活血通络、理气化痰、宣痹通阳等功效，用于治疗脑血管障碍、高血压、冠心病等。〈本经〉主恶血破症结积聚、〈药性论〉治诸风痹痿、破宿血。〈本草再新〉：镇肝风，凉肝火，散湿破泻、益气化痰、散湿破血；〈本经逢源〉：专破恶积聚。〈本草便读〉：善行善破，专入肺、肝、宣肺之滞，疏肝之瘀。〈本草汇言〉：祛风下气，行水化瘀之药也。〈本草纲目〉：古方补肾制风皆用刺蒺藜。

从上述医书记载，白蒺藜是一味作用很强的中药为历代医家推荐之精品。

近年来，国内外学者对蒺藜全草（以下简称白蒺藜）的研究工作也在不断深入，各种化学提取物进行中药药理研究，不断有研究报道，认为白蒺藜提取物有抗动脉粥样硬化作用，能显著降低实验性高胆固醇水平，防止动脉、心肌、肝脏中脂质的沉淀作用，能缩小实验性心肌梗塞的范围，具有明显的抗心肌缺血的能力等。虽然对白蒺藜作了很多的化学结构、化学提取工作，但目前在蒺藜中尚未确定一个对治疗心脑血管疾病理想的药物。

本发明的目的对白蒺藜植物进行化学分离，寻找出有效部位或单体进行药理临床试验，找到一种对心脑血管疾病有效药物。

本发明的另一目的是寻找一种对心脑血管疾病的有效部位或单体的制备方法。

白蒺藜有效成份提取:

白蒺藜经大量实验证明抗脑血管障碍病变的有效组分是属水溶性极大的皂甙类化合物, 其中主要的活性成份是水解后为 Hecogenin (海可甙元) 甙元和 Tigogenin (提集甙元) 甙元的带 5 个或 6 个糖的呋甙皂甙。对粗提取方法首先研究了 75%乙醇提取法、水提取物乙醇沉淀法和水提取液通大孔树脂法, 三种方法比较, 用 75%乙醇提取物中含有很多脂溶性物, 浓缩浸膏需用大量 CHCl_3 先处理除去脂溶性物, 再进行大孔树脂分离, 该方法成本高, 需用大量的乙醇和氯仿。水提乙醇沉淀法, 必须先浓缩水提液, 浓缩液再用乙醇沉淀除无效的杂质, 因为含有大量皂甙, 浓缩时易产生大量泡沫带来困难。第三种方法是水提液直接通过大孔树脂, 将皂甙富集, 此工艺免除了大量的水溶液浓缩产生泡沫而冲料的困难, 大孔树脂能富集皂甙, 除去大量无效杂质, 且能反复使用, 在富集皂甙后用 60%乙醇洗脱即可, 该工艺适合于大生产, 且比较经济。

上述方法所得的粗品, 再经柱层析, 用甲醇:水洗脱, 每一流分为 50ml, 收集 24-26 流分、合并除去溶剂得 1b, 其他流分合并, 再进行几次柱层析, 流动相用氯仿:甲酸:水洗脱, 相继分得 2a, 2b, 3a, 3b。

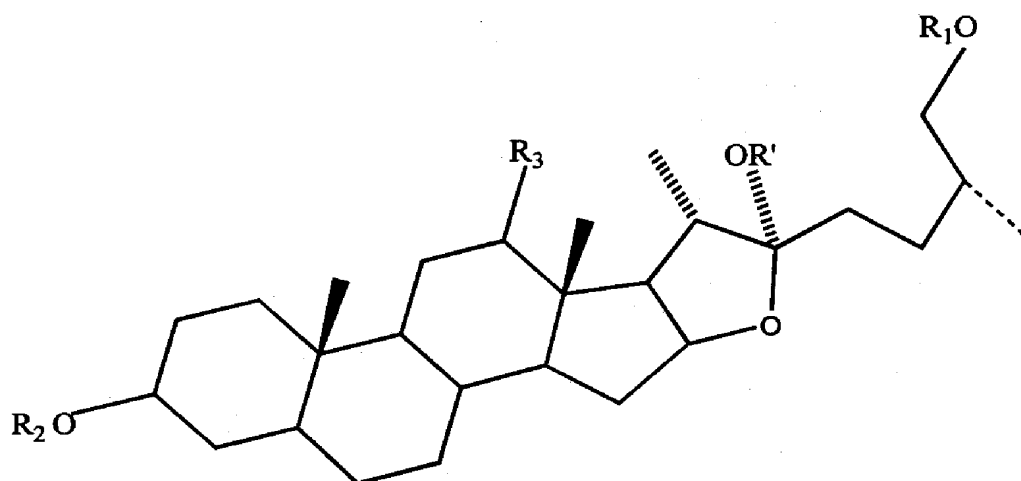
同样也可采用 MCI Gel 柱, 先用 H_2O 洗脱, 再用 H_2O :乙醇梯度洗脱, 100ml 为一流分, 初步分离, 用 THL 控制, 合并相同斑点的流分, 再分别进行多次正相硅胶柱层析, 流动相同前, 得 1b, 2a, 2b, 3a, 3b。

图 1 为白蒺藜有效组分提取工艺流程

首先是白蒺藜全草磨成粗粉,然后加水煮提二次过滤分出水提液和药渣。药渣再加水煮提, 过滤, 分出的药渣丢弃, 水提液作为下一料的水量, 前二次的水提液, 5—10℃放置 12 小时, 过滤, 滤液通过 1400 型树脂, 药液通过后, 继续用水洗, 洗到流出量为无色为止, 分出水洗脱液, 通过的药液通完后, 用 60%—70%乙醇洗脱, 洗脱液减压蒸馏回收乙醇, 继续浓缩至比重 1.37—1.40 之间, 浓缩液加数倍量乙醇, 使其呈溶液 5—10℃放置 12 小时, 分出上清液, 沉淀浆过滤, 滤渣丢弃, 滤液与分出上清液合并, 减压浓缩呈浸膏, 上硅胶柱, 按浸膏 : 硅胶 = 1:10。氯仿冲洗, 然后氯仿:甲醇梯度洗脱合并有效成分组分, 然后减压浓缩至干, 得产品。

采用上述有效成份提取工艺所得的产品, 620mg 通过 Fuji gel (破碎型递相用的硅胶, ODSG 3 型) 柱, 用甲醇: 水=6:4 洗脱, 每一流分 50ml, 以 24-26 流分分得 1b, 其他流分合并, 再进行几次硅胶柱层析 (青岛海洋化工厂生产的层析硅胶 100-200 目) 用氯仿: 甲醇: 水=7:3:0.5 洗脱, 相继分得 1a, 2a, 2b, 3a, 3b, 上述有效成份经过反复的正相及反相柱层析, 主要成份为中极性的皂甙, 分离得到 6 个呋甙皂甙化合物, 它们是 JL-saponin. 1a.

它们的化学结构为:



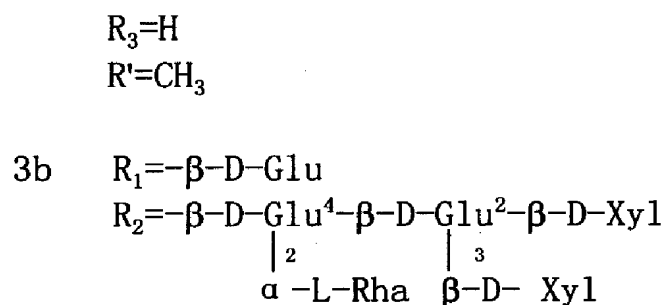
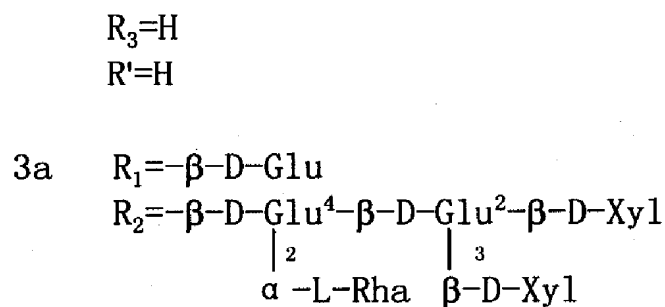
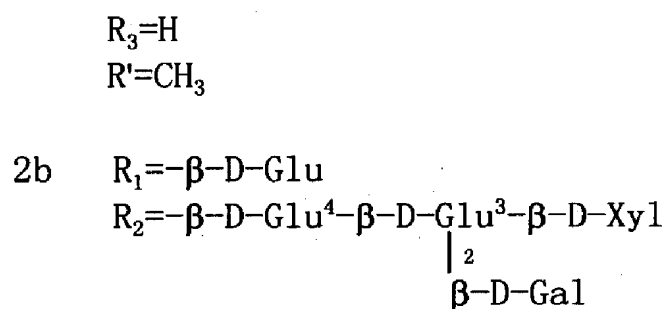
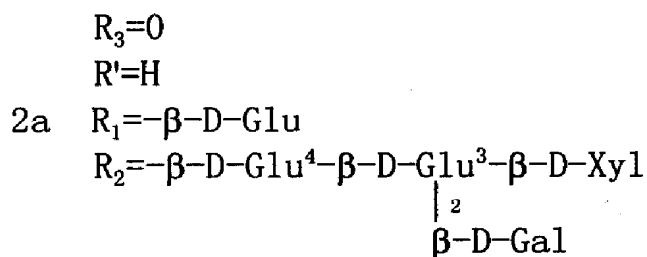
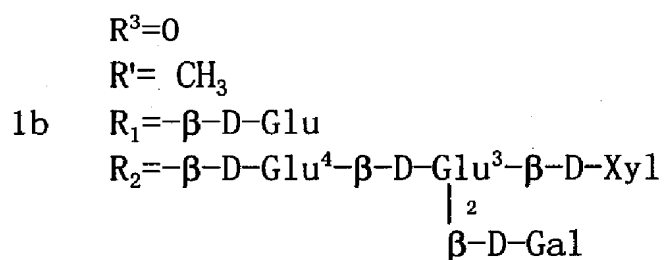
R_1 为 $-\beta\text{-D-Glu}$

R_2 为 $-\beta\text{-D-Glu}^4-\beta\text{-D-Glu}^2-\beta\text{-D-Xyl}$
 $\quad \quad \quad \begin{array}{c} | \\ 2 \\ \alpha\text{-L-Rha} \end{array} \quad \begin{array}{c} | \\ 3 \\ \beta\text{-D-Xyl} \end{array} \quad ;$
 $-\beta\text{-D-Glu}^4-\beta\text{-D-Glu}^3-\beta\text{-D-Xyl}$
 $\quad \quad \quad \begin{array}{c} | \\ 2 \\ \beta\text{-D-Gal} \end{array}$

R_3 为 H; O

R' 为 CH_3 、H

1a $R_1 = -\beta\text{-D-Glu}$
 $R_2 = -\beta\text{-D-Glu}^4-\beta\text{-D-Glu}^3-\beta\text{-D-Xyl}$
 $\quad \quad \quad \begin{array}{c} | \\ 2 \\ \beta\text{-D-Gal} \end{array}$


 $R_3=H$
 $R'=H$

见表 1-3 1H NMR 和 ^{13}C NMR

表 1-3 中数据均以吡啶溶剂峰定标 (1H NMR 7.190, ^{13}C NMR 123.55)

表 1 呋甾皂甙 JL-saponin 1a 及 1b 核磁数据

| No. (c) | ^{13}C (δ) | | ^1H (δ) | |
|---------------------------------|------------------------------|--------|---------------------------|-----------------------|
| | 1a | 1b | 1a | 1b |
| 1 | 36.54 | 36.53 | | |
| 2 | 29.65 | 29.64 | | |
| 3 | 77.48 | 77.47 | | |
| 4 | 34.64 | 34.61 | | |
| 5 | 44.40 | 44.38 | | |
| 6 | 28.52 | 28.50 | | |
| 7 | 31.61 | 31.61 | | |
| 8 | 34.22 | 34.21 | | |
| 9 | 55.47 | 55.45 | | |
| 10 | 36.18 | 36.16 | | |
| 11 | 37.85 | 37.88 | | |
| 12 | 212.75 | 212.84 | | |
| 13 | 55.75 | 55.72 | | |
| 14 | 55.63 | 55.62 | | |
| 15 | 31.29 | 31.61 | | |
| 16 | 79.82 | 79.57 | | |
| 17 | 55.47 | 54.98 | 2.65 (dd, J=8.2, 6.3) | 2.87 (dd, J=8.3, 6.7) |
| 18 | 15.95 | 16.13 | 1.02 | 1.10 |
| 19 | 11.61 | 11.60 | 0.62 | 0.63 |
| 20 | 41.03 | 41.14 | | |
| 21 | 14.94 | 15.13 | 1.38 (J=6.8) | 1.53 (J=6.7) |
| 22 | 112.65 | 110.65 | | |
| -OCH ₃ | 47.29 | | 3.23 | |
| 23 | 30.64 | 37.01 | | |
| 24 | 28.11 | 28.29 | | |
| 25 | 34.11 | 34.14 | | |
| 26 | 75.10 | 75.09 | | |
| 27 | 17.04 | 17.33 | 0.96 (J=6.6) | 0.96 (J=6.6) |
| Sugar-1 (β -D-galactose) | | | | |
| 1 | 105.23 | 105.22 | 5.44 (J=7.7) | 5.45 (J=7.7) |
| 2 | 73.69 | 73.69 | | |
| 3 | 73.94 | 73.89 | | |
| 4 | 70.32 | 70.34 | | |
| 5 | 77.24 | 77.25 | | |
| 6 | 60.47 | 60.42 | | |
| Sugar-2 (β -D-glucose) | | | | |
| 1 | 105.46 | 105.47 | 5.14 (J=7.8) | 5.16 (J=7.9) |
| 2 | 81.01 | 81.01 | | |
| 3 | 85.54 | 85.69 | | |
| 4 | 70.53 | 70.52 | | |
| 5 | 77.29 | 77.25 | | |
| 6 | 62.99 | 62.98 | | |
| Sugar-3 (β -D-xylose) | | | | |
| 1 | 104.73 | 104.72 | 5.01 (J=7.0) | 5.05 (J=7.0) |
| 2 | 74.99 | 74.49 | | |
| 3 | 78.41 | 78.37 | | |
| 4 | 70.65 | 70.62 | | |
| 5 | 67.17 | 67.16 | | |
| Sugar-4 (β -D-glucose) | | | | |
| 1 | 102.24 | 102.20 | 4.86 (J=7.6) | 4.87 (J=7.6) |
| 2 | 72.99 | 72.96 | | |
| 3 | 75.67 | 75.70 | | |
| 4 | 79.53 | 79.50 | | |
| 5 | 75.32 | 75.32 | | |
| 6 | 62.45 | 62.51 | | |
| Sugar-5 (β -D-glucose) | | | | |
| 1 | 104.89 | 104.84 | 4.81 (J=7.8) | 4.79 (J=7.7) |
| 2 | 75.13 | 75.17 | | |
| 3 | 78.55 | 78.51 | | |
| 4 | 71.68 | 71.62 | | |
| 5 | 78.34 | 78.33 | | |
| 6 | 62.82 | 62.74 | | |

表 2 呋甾皂甙 JL-saponin 2a 及 2b 核磁数据

| No. (c) | ^{13}C (δ) | | ^1H (δ) | |
|---------------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------------|--------------|
| | 2a | 2b | 2a | 2b |
| 1 | 37.08 | 37.15 | | |
| 2 | 29.87 | 29.93 | | |
| 3 | 77.60 | 77.64 | | |
| 4 | 34.81 | 34.83 | | |
| 5 | 44.64 | 44.64 | | |
| 6 | 28.84 | 28.89 | | |
| 7 | 32.32 | 32.38 | | |
| 8 | 35.13 | 35.17 | | |
| 9 | 54.39 | 54.37 | | |
| 10 | 35.72 | 35.75 | | |
| 11 | 21.12 | 21.23 | | |
| 12 | 39.92 | 40.15 | | |
| 13 | 41.02 | 41.06 | | |
| 14 | 56.27 | 56.31 | | |
| 15 | 31.99 | 32.33 | | |
| 16 | 81.24 | 81.08 | | |
| 17 | 64.24 | 63.88 | | |
| 18 | 16.36 | 16.70 | 0.75 | 0.82 |
| 19 | 12.20 | 12.25 | 0.60 | 0.58 |
| 20 | 40.41 | 40.62 | | |
| 21 | 16.20 | 16.45 | 1.15 (J=6.6) | 1.29 (J=6.6) |
| 22 | 112.53 | 110.62 | | |
| -OCH ₃ | 47.20 | | 3.23 | |
| 23 | 30.72 | 37.15 | | |
| 24 | 28.11 | 28.34 | | |
| 25 | 34.09 | 34.22 | | |
| 26 | 75.03 | 75.13 | | |
| 27 | 17.01 | 17.43 | 0.96 (J=6.6) | 0.93 (J=6.6) |
| Sugar-1 (β -D-galactose) | | | | |
| 1 | 105.11 | 105.29 | 5.41 (J=7.8) | 5.43 (J=7.6) |
| 2 | 73.59 | 73.72 | | |
| 3 | 73.94 | 73.92 | | |
| 4 | 70.19 | 70.26 | | |
| 5 | 77.11 | 77.26 | | |
| 6 | 60.43 | 60.50 | | |
| Sugar-2 (β -D-glucose) | | | | |
| 1 | 105.34 | 105.51 | 5.11 (J=8.4) | 5.14 (J=7.7) |
| 2 | 81.92 | 81.08 | | |
| 3 | 85.67 | 85.43 | | |
| 4 | 70.46 | 70.56 | | |
| 5 | 77.39 | 77.49 | | |
| 6 | 62.93 | 63.03 | | |
| Sugar-3 (β -D-xylose) | | | | |
| 1 | 104.68 | 104.72 | 5.01 (J=7.8) | 5.05 (J=6.9) |
| 2 | 74.83 | 74.90 | | |
| 3 | 78.26 ^b | 78.34 ^c | | |
| 4 | 70.59 | 70.67 | | |
| 5 | 67.10 | 67.17 | | |
| Sugar-4 (β -D-glucose) | | | | |
| 1 | 102.24 | 102.28 | 4.85 (J=7.2) | 4.88 (J=7.7) |
| 2 | 72.99 | 73.04 | | |
| 3 | 75.23 | 75.32 ^d | | |
| 4 | 79.54 | 79.57 | | |
| 5 | 75.36 | 75.66 ^d | | |
| 6 | 62.28 | 62.34 | | |
| Sugar-5 (β -D-glucose) | | | | |
| 1 | 104.79 | 104.85 | 4.78 (J=7.8) | 4.77 (J=7.7) |
| 2 | 75.11 | 75.26 | | |
| 3 | 78.45 | 78.52 | | |
| 4 | 71.63 | 71.60 | | |
| 5 | 78.30 ^b | 78.42 ^e | | |
| 6 | 62.77 | 62.72 | | |

表 3 呋甾皂甙 JL-saponin 3a 及 3b 核磁数据

| No. (c) | ^{13}C (δ) | | ^1H (δ) | |
|-------------------------|---------------------|--------|------------------|--------------|
| | 3a | 3b | 3a | 3b |
| 1 | 37.24 | 37.22 | | |
| 2 | 29.94 | 29.91 | | |
| 3 | 77.01 | 76.91 | | |
| 4 | 34.21 | 34.32 | | |
| 5 | 44.67 | 44.60 | | |
| 6 | 28.98 | 28.95 | | |
| 7 | 32.42 | 32.43 | | |
| 8 | 35.24 | 35.22 | | |
| 9 | 54.43 | 54.40 | | |
| 10 | 35.92 | 35.89 | | |
| 11 | 21.21 | 21.25 | | |
| 12 | 40.00 | 40.17 | | |
| 13 | 41.11 | 41.07 | | |
| 14 | 55.36 | 56.35 | | |
| 15 | 32.11 | 32.43 | | |
| 16 | 81.33 | 81.10 | | |
| 17 | 64.35 | 63.97 | | |
| 18 | 16.49 | 16.70 | 0.76 | 0.84 |
| 19 | 12.41 | 12.40 | 0.82 | 0.84 |
| 20 | 40.51 | 40.67 | | |
| 21 | 16.32 | 16.47 | 1.17 (J=6.9) | 1.32 (J=6.5) |
| 22 | 112.61 | 110.58 | | |
| -OCH ₃ | 47.27 | | 3.24 | |
| 23 | 30.83 | 37.22 | | |
| 24 | 28.20 | 28.37 | | |
| 25 | 34.21 | 34.27 | | |
| 26 | 75.20 | 75.28 | | |
| 27 | 17.15 | 17.47 | 0.97 (J=6.5) | 0.96 (J=6.4) |
| Sugar-4 (β-D-galactose) | | | | |
| 1 | 100.15 | 100.09 | 4.84 (J=7.7) | 4.83 (J=8.0) |
| 2 | 76.64 | 76.51 | | |
| 3 | 76.64 | 76.66 | | |
| 4 | 81.33 | 81.30 | | |
| 5 | 75.80 | 75.83 | | |
| 6 | 60.42 | 60.40 | | |
| Sugar-2 (β-D-glucose) | | | | |
| 1 | 105.34 | 105.33 | 4.99 (J=7.8) | 4.99 (J=8.0) |
| 2 | 81.49 | 81.53 | | |
| 3 | 87.61 | 87.55 | | |
| 4 | 70.43 | 70.41 | | |
| 5 | 77.77 | 77.77 | | |
| 6 | 62.91 | 62.90 | | |
| Sugar-1 (β-D-xylose) | | | | |
| 1 | 105.01 | 104.96 | 5.24 (J=7.7) | 5.25 (J=7.6) |
| 2 | 75.09 | 75.08 | | |
| 3 | 78.75 | 78.76 | | |
| 4 | 70.72 | 70.71 | | |
| 5 | 67.67 | 67.34 | | |
| Sugar-3 (β-D-xylose) | | | | |
| 1 | 105.83 | 105.86 | 5.41 (J=7.6) | 5.42 (J=7.7) |
| 2 | 75.09 | 75.08 | | |
| 3 | 79.08 | 79.11 | | |
| 4 | 70.88 | 70.88 | | |
| 5 | 67.34 | 67.70 | | |
| Sugar-5 (α-D-rhaminose) | | | | |
| 1 | 102.00 | 101.98 | 6.19 | 6.20 |
| 2 | 72.45 | 72.46 | | |
| 3 | 72.72 | 72.70 | | |
| 4 | 74.00 | 73.97 | | |
| 5 | 69.35 | 69.36 | | |
| 6 | 18.46 | 18.46 | 1.70 (J=6.1) | 1.70 (J=5.8) |
| Sugar-6 (β-D-glucose) | | | | |
| 1 | 105.01 | 105.03 | 4.84 (J=7.7) | 4.81 (J=7.8) |
| 2 | 75.20 | 75.20 | | |
| 3 | 78.64 | 78.62 | | |
| 4 | 71.76 | 71.65 | | |
| 5 | 78.53 | 78.53 | | |
| 6 | 62.91 | 62.79 | | |

表 1-3 中数据均以吡啶峰定标 CH' NMR 7.190, ^{13}C MNR 123.55

白蒺藜经大量试验证明抗脑血管障碍病变的有效成分是属于水溶性极大的皂甙类化合物，其中主要的活性成分是水解后为 Hecogenin 甙元和 Tigogenin 甙元的带 5 个或 6 个糖的呋甙皂甙。

白蒺藜有效组分进行药理、毒理试验证明它对缺血性脑梗塞的预防和治疗有作用。白蒺藜有效组分口服 2.5-20mg/kg 对大鼠双侧颈动脉结扎合并低血压引起全脑缺血再灌注脑损伤有非常明显的保护作用。在清醒状态四动脉结扎大鼠全脑缺血再灌注模型上，白蒺藜 2.5-10mg/kg 口服，对阴性对照比较明显延长缺血后脑电图消失及减少再灌注的脑电图和翻正反射回复，与尼莫地平（5mg/kg 口服）和心脑舒通（25、50mg/kg 口服）比较，作用强度明显高于对照组样品，提示其对大鼠全脑缺血引起脑损伤有明显保护作用，在大鼠中动脉结所模型上，白蒺藜提取物 2.5-10mg/kg 口服，对大鼠局灶性脑梗死有明显的治疗作用，其组织学和行为学评价均明显改善，且与剂量有一定关系，作用明显强于尼莫地平。试验结果表明，白蒺藜提取物对动物实验性脑梗塞模型有明显的预防和治疗作用。

对心肌梗塞的预防和治疗作用

抗胸痹心痛的药效学试验结果表明，白蒺藜提取物 10-40mg/kg 十二指肠给药能显著降低冠脉结扎狗心外膜心电图的心肌缺血程度，缩小心肌缺血范围，作用强度与剂量有一定关系，定量组织学检测结果与心外膜心电图结果一致，与对照组比较梗塞区域显著减小，证明白蒺藜对狗冠状动脉结扎所引起的心肌梗塞有明显的治疗效果。试验结果表明，白蒺藜使血清 LDH 比值产生剂量依赖性的下降，提示白蒺藜对心肌细胞有保护作用。白蒺藜提取物 10-40mg/kg 口服对垂体后叶素引起的大鼠心肌缺血有明显的预防作用。试验结果支持，白蒺藜对胸痹心痛症具有明显的预防和治疗作用。

白蒺藜有效组分安全性实验研究表明，急性毒性口服 LD_{50} 大于 5000mg/kg，静脉注射雌性 187.73mg/kg，雄性 204.41mg/kg，雌雄两个性别无显著性差别。大鼠和 Beagle 狗进行了 90 天给药长期毒性试验，前者结果表明各剂量组血液学、生物化学和尿液检查基本上均在正常范围之内，且与

药物剂量无关。仅认为体重在个别时间与对照有明显差异，整个实验过程中未发现与药物毒性有关的异常变化。组织病理检查及脏器系数测定结果表明，给药结束时和恢复期活杀动物未见与药物毒性有关的病理改变；后者研究结果表明，Beagle 狗口服白蒺藜各组在给药和恢复期间，一般行为活动未见异常，毛发光泽，饮水和进食量正常。未观察到实验动物体重、体温和心电图出现与药物作用有关的改变。实验动物 14 项血液学和 15 项血液生化指标未见明显变化。病理组织学检查未见与药物有关的药理改变。

实施例 1

白蒺藜有效组分提取

蒺藜全草粗粉，加 12 倍量水煮沸，100℃保温 2 小时，放出煎煮液，再加 8 倍水煮沸，保温 1-2 小时，放出煎煮液，二次煎煮液合并、装桶，置于冷库（5-10℃）12 小时（第三次加 8 倍水量，煮 2 小时，煎煮液作下一料水用）。次日，用离心过滤，滤液通过大孔树脂 1400 型柱（药材(g):树脂(cm³)=2:1），药液经大孔树脂吸附完毕后用水冲洗至微黄色为止，继续用 60%—70%乙醇洗脱至无皂甙反应为止，收集 60%—70%乙醇洗脱液（大孔树脂按常法处理，最后用水冲洗至中性，重复使用），60%—70%乙醇洗脱液先回收乙醇，后减压浓缩至浓缩液，比重 1.37-1.40 间，加 8 倍量 95%乙醇，边加边搅拌，加毕后，冷库（5-10℃）放置 10—15 小时，次日吸取澄清液，沉淀部分成粘稠物，用适量 60%乙醇洗滤二次，滤液与澄清液合并，回收乙醇，继续浓缩成干浸膏，得率为生药量的 2.2-2.5%。干浸膏用 95%乙醇溶解，溶液拌于少量硅胶，在水浴上挥去乙醇，然后在烘箱 70℃烘干，冷却后取出研磨成细粉，过筛，然后装柱，开始用氯仿冲洗，然后用氯仿：甲醇为 85%—65%：15%：35%梯度洗脱，用硅胶薄层层析检查控制，有效成分冲完为止。合并含有效成分冲洗液，减压回收溶剂，继续抽干，真空烘箱 70℃干燥，降至室温，取出磨成细粉，过 80 目筛，干燥保存备用，有效组分得率为 0.5%。

实施例 2

白蒺藜有效组分对大鼠失血性低血压合并双侧颈动脉结扎引起脑缺血后再灌注的保护作用

供试样品:

名称: 白蒺藜有效组分

来源: 中科院上海药物所

批号: 971128

含量: 含中极性皂甙约 50%

形状: 本品为棕黄色粉末

配制: 将本品精确称量后加入 1%西黄蓍胶溶液研磨, 配成浓度分别为 0.025、0.5、1.0 和 2.0mg/ml 混悬液。

对照样品:

名称: 尼莫地平

来源: 山东新华制药厂生产

批号: 9203033

含量: 101.29%

形状: 淡黄色结晶性粉末

配制: 用 1%西黄蓍胶溶液研磨, 配成含量为 0.5mg/ml 混悬液

试验动物

品系: SD 大鼠

性别: 雄性

体重: 250-300 克

来源: 中科院上海动物中心

动物合格证: 沪动合证字 005 号

饲养: 恒温净化通风动物房, 自由进食与饮水, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

试验方法

试验方法参照《药理实验方法学》第二版 P947。将大鼠以乌拉坦 1.2g/kg

腹腔麻醉，颅顶部安放电极记录脑电图，股动脉插管记录血压，右侧颈外静脉插管至右心室，迅速抽取血液，至血压降至 70mmHg 时，用动脉夹夹闭双侧颈动脉，继续抽取血液至血压为 40-45mmHg，可见 EEG 变为平线，开始计时，10 分钟后开放颈动脉，同时将抽出的血液重新注入动物体内，使血压恢复正常，观察 EEG 恢复时间。

试验样品采用口服给药，试验前口服 3 天，试验当日在实验前 1 小时给药。给药剂量为 2.5、5.0、10 和 20mg/kg，体积为 10ml/kg，阴性对照组给予生理盐水 10ml/kg，阳性对照组为尼莫地平 5mg/kg。

所有数据均用 $\bar{x} \pm S$ 表示，统计学分析用 t 检验。

结果见表 1。

生理盐水组再灌注后脑电恢复时间为 977 ± 134 秒。白蒺藜口服给药剂量在 2.5-20mg/kg 的脑电恢复时间均非常明显缩短，高剂量组的恢复时间小于生理盐水组的 1/2，与生理盐水组比较，差异均非常显著 ($P < 0.01$)。阳性对照尼莫地平组也非常显著减少脑电恢复时间。

表 1、白蒺藜口服给药对大鼠失血性低血压合并双侧颈动脉结扎引起脑缺血后再灌注脑电图恢复时间的影响 ($\bar{x} \pm S$)。

| 组别 | 剂量(mg/kg) | 动物数(只) | 脑电图恢复时间(S) |
|------|-----------|--------|---------------------|
| 生理盐水 | 5ml/kg | 7 | 977 ± 134 |
| 尼莫地平 | 5.0 | 8 | $415 \pm 177^{***}$ |
| 白蒺藜 | 2.5 | 9 | $604 \pm 137^{***}$ |
| | 5.0 | 8 | $468 \pm 255^{***}$ |
| | 10.0 | 10 | $379 \pm 112^{***}$ |
| | 20.0 | 6 | $375 \pm 101^{***}$ |

$P > 0.05$, $**P < 0.05$, $***p < 0.01$ 与生理盐水组比较

蒺藜对大鼠全脑缺血再灌注引起的脑损伤有非常明显的保护作用。

实施例 3

白蒺藜有效组分对大鼠大脑中动脉结扎脑缺血的影响

试验材料

受试样品和对照样品

白蒺藜，尼莫地平，来源、批号及配制方法同实施例 1

试验仪器

SW-30 射频双极凝固器（上海市检测技术所检测仪器厂生产）

307-6 台式牙钻车（上海齿科医械厂生产）

SXP-1B 手术显微镜（上海医用光学仪器厂生产）

试验动物

雄性 wistar 大鼠，体重 260-300 克。

实验方法

取雄性 Wistar 大鼠，体重 260-300g，共 50 只，随机分成 5 组，将动物用 10%水合三氯乙醛 300mg/kg 腹腔麻醉，按 Tamura 的方法制备脑缺血模型，并与术后清醒时及 24 小时进行行为学评分，评分采用单盲法，凡术后评分低于 9 分者给予剔除，在大鼠右侧大脑中动脉阻断 24 小时，断头取脑，在显微镜下进一步确证右侧大脑中动脉已在嗅束与大脑下静脉之间烧断且脑实质无损害者，将其进行切片染色，称坏死区重及大脑右半球重，计算坏死区与大脑右半球的百分比。所有的数据的统计学分析用 t 检验。

白蒺藜有效组分分别为低剂量（2.5mg/kg）、中剂量（5mg/kg）和高剂量（10mg/kg）三个组。样品经口灌胃给药，体积为 1ml/100g，阳性对照组口服尼莫地平混悬液 5mg/kg，阴性对照组口服相同体积的生理盐水，术前 30 分钟给药。

试验结果见表 2。

从表 3 可以看出，白蒺藜有效组分中剂量组及高剂量组能使坏死区脑组织重量及坏死区与右半球的百分比比较阴性对照组非常明显地降低（ $p < 0.01$ ），低剂量组大鼠脑缺血坏死百分率减少，但差异不显著（ $p = 0.098$ ），阳性对照

(尼莫地平组)也能缩小大鼠脑缺血坏死区的范围,但无明显差异($p=0.072$)。对术后 24 小时大鼠的行为评分,白蒺藜中、高剂量组也有降低,但仅中剂量组有显著差异($P<0.01$)。

表 2 白蒺藜有效组分对中动脉结扎大鼠的组织学和行为学影响

| 组别 | 动物数 | 行为学评分 | | 大脑右半球重(g) | 坏死区重(g) | 坏死百分率(%) |
|-------|-----|---------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| | | 术后 | 24h | | | |
| 阴性对照组 | 10 | 9.6±0.5 | 8.2±1.8 | 0.742±0.016 | 0.214±0.079 | 28.8±10.6 |
| 阳性对照组 | 9 | 9.7±0.5 | 8.3±2.0 | 0.739±0.013 | 0.151±0.051 | 20.5±6.8* |
| 低剂量组 | 10 | 9.7±0.5 | 8.1±2.0 | 0.734±0.015 | 0.152±0.063 | 20.8±8.8* |
| 中剂量组 | 10 | 9.6±0.5 | 5.6±2.7** | 0.733±0.012 | 0.099±0.063 | 13.4±8.4*** |
| 高剂量组 | 9 | 9.7±0.5 | 6.7±2.6 | 0.732±0.020 | 0.105±0.053 | 14.2±6.8*** |

* $P<0.10$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ 与阴性对照组比较

蒺藜有效组分对大鼠大脑中动脉结扎引起的局灶性脑梗死有明显的治疗作用,其药效与剂量有一定关系。

实施例 4

白蒺藜有效组份对狗冠状动脉结扎心梗治疗作用

试验材料

名称: 白蒺藜有效组分

来源: 中科院上海药物所

批号: 971128

含量: 含皂甙约 50%

形状: 本品为棕黄色粉末

配制: 将本品精确称量后加入 1%西黄蓍胶溶液研磨,配成浓度分别为 10、20 和 40mg/ml 混悬液

对照样品 1:

名称: 硝本地平

来源: 上海市第十七制药厂

批号: 851118

含量：99.6%

形状：黄色结晶性粉末

配制：用 1%西黄蓍胶溶液研磨，配成含量为 5mg/ml 混悬液

对照样品 2：

名称：心脑舒通

来源：吉林敖东洮南药业有限公司

批号：990402

含量：每粒内容物重 152.42 ± 3.99 mg，含呋甾皂甙 15mg

形状：棕黄色粉末

配制：用 1%西黄蓍胶溶液研磨，配成含量为 100mg/ml 混悬液，含皂甙 10mg/ml

其他药品：

戊巴比妥钠，批号 860901，佛山市化工试验厂进口分装，用生理盐水配成 3.5%溶液。

利多卡因注射液，100mg/5ml，批号 990402，上海旭东海普药业有限公司生产。

5%葡萄糖+0.9%氯化钠注射液，500ml 瓶装，批号 9708272，上海长征制药厂生产。

氯化硝基四氮唑蓝，批号 970421，军事医学科学院药材供应站分装，用 0.1M pH 7.4 磷酸缓冲液配成 0.1 溶液。

乳酸脱氢酶（LDH）酶法显色合，批号 980906，上海化学试剂研究所生产。

杂种狗 25 条，雌雄兼用，体重 10.3 ± 1.8 kg，随机分为 5 组。由本院动物房提供。

试验仪器

Mingograf-82 型八道生理记录仪，由 Seimens-Elema 公司生产。

SC-3 电动人工呼吸机，上海医疗器械四厂生产。

GPS-2 高频电刀，武进无线电厂生产。

722 型光栅分光光度计，上海第三分析仪器厂生产。

80-2 型离心机，上海手术器械厂生产。

剂量设置：

低剂量为 10mg/kg，低、中、高剂量比为 1:2:4，相应中高剂量分别为 20 和 40mg/kg。阳性对照一为钙拮抗剂硝苯地平，剂量为 5 mg/kg；另一阳性对照心脑舒通剂量为 100 mg/kg，以皂甙计约 10 mg/kg，与试验样品中剂量组皂甙含量相当。本品临床给药途径为口服给药，应采用与临床途径一致的灌胃给药，但考虑麻醉状态下动物胃蠕动减慢，向肠内排空明显延长，影响样品吸收，故采用十二指肠给药。

试验方法：

将狗用 3.5%戊巴比妥钠 35mg/kg 静脉注射麻醉，同时经口插入麻醉用气管导管（Curity®，内径 9.5mm，泰国产），接人工呼吸机，以 30 次/分频率，呼吸时比 1.5:1 进行人工呼吸，调节潮气量至呼吸正压为 15cmH₂O。将动物左侧卧固定于手术台上，于右侧腹股沟处分离股静脉，插入导管作输液用。上腹部正中切口，小心找出十二指肠，距幽门 3cm 处作荷包缝合并插管，连接三通作给药用。左侧胸壁第 4、5 肋间开胸，用扩张器张开胸腔，距迷走神经 2cm 处沿神经走向剪开心包，然后将心包缝合于胸壁，充分暴露心脏；在冠状动脉左前降支第二至第三分枝间游离冠状动脉，其下穿线二根，将按文献所制的 30 点心外膜电极四角用心血管无损伤连线缝合针缝合于心脏表面，电极间距 8mm，同步描记正常肢体导联 I、II、III 和加压肢体导联 aVR、aVL、aVF 导联，然后描记表面 30 点心电图，描记肢体导联时心电图定标 8mm/mv，心外膜电图定标为 1mm/mv，记录纸速 25mm/s。采用 Harris 两步结扎法：首次结扎前 2 分钟，从股静脉 iv 利多卡因 5mg/kg，在结扎时加入一 6 号注射针，结扎后拔去；在首次结扎后 30 分钟，行第二次结扎。第二次结扎后 10 分记录心外膜电图为给药前数据，然后从十二指肠导管以 1ml/kg 体积给予试验样品，阴性对照组给予同体积 1%西黄蓍胶溶

液。分别于给药后 0.5, 1.0, 1.5, 2 和 3 小时记录心外膜电图, 测出各点心电图 ST 段升高总和 (Σ -ST) 值和 ST 段升高 $\geq 2\text{mv}$ 的心电导联数 (N-ST)。在第 3 小时处死动物, 迅速取出心脏, 称出全心重量, 切去心房及右心室, 称出左心室重量, 放入冰箱速冻 1 小时, 在冠脉结扎线下, 平行于冠状沟将心室等厚切成 5 片, 放入 0.1% 硝基四氮唑蓝 (N-BT) 溶液中, 于 37°C 恒温水浴振摇染色 10 分钟。正常心肌染为暗蓝色, 梗塞区心肌不着色为浅红色, 仔细切下梗塞部分, 称出梗塞区重量, 计算出梗塞区重量占全心及左室重量的百分比。冠脉结扎前及给药后 3 小时各采右心室血 3ml, 3000rpm 离心 15 分钟, 取血清测 LDH。样品管加待测血清 $20\mu\text{l}$, 标准管加 LDH 标准液 $20\mu\text{l}$, 空白管加生理盐水 $20\mu\text{l}$, 然后各管加反应液 2.0ml, 37°C 孵育 15 分钟后加停止液 0.5ml, 用空白管调零, 于分光光度计 C 档调整标准管读数至 500, 即可在仪器上直接读出各测试管 LDH 值。

数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示。给药前后变化的统计检验用各组不同时间点变化百分率同生理盐水组同一时间变化率作组间 t 检验。

试验结果:

对心外膜电图心肌缺血程度的影响:

结扎后 10 分钟, 各组心电图 ST 段总和 (Σ ST) 明显升高。白蒺藜低剂量组使心肌缺血程度 (Σ ST) 下降, 但无显著差异 ($P=0.088$, $t=3$ 小时); 中剂量 Σ ST 下降在给药后 3 小时起有显著差异 ($P<0.05$); 高剂量组给药 1.5 小时后心肌缺血程度下降显著 ($P<0.05$), 第 3 小时非常显著 ($P<0.01$); 白蒺藜高剂量组降低心肌缺血程度的作用大于低剂量组。阳性对照硝苯地平组在给药 1.5 小时后, Σ ST 段下降有显著差异 ($P<0.05$), 3 小时后同阴性对照组相比差异非常显著 ($P<0.01$); 阳性对照心脑舒通组给药 3 小时有显著差异 ($P<0.05$), 下降程度与白蒺藜中剂量组相近。阴性对照组, 给 1% 西黄蓍胶溶液后 Σ ST 段轻度上升, 后略有起伏。试验结果见表 3。

试验结果表明, 白蒺藜 20 至 40mg/kg 口服给药对狗冠脉结扎引起的心电图的心肌缺血程度有显著的治疗作用。

对心外膜心电图心肌缺血范围（NST）的影响：

白蒺藜 10mg/kg 口服给药后 NST 下降，但无显著差异（ $P=0.060$ ，3 小时）；20mg/kg 组 3 小时 NST 值同阴性对照组相比下降显著；高剂量组在给药后心肌缺血范围下降，但从 2 小时起有显著差异。阳性对照硝苯地平组在给药 1.5 小时后心肌缺血范围显著减小（ $P<0.05$ ）；阳性对照心脑舒通组给药无显著差异（ $P=0.061$ ），下降程度略低于白蒺藜中剂量组。阴性对照组心肌缺血范围随时间无明显变化。试验结果见表 4。

试验结果表明，白蒺藜 20 至 400mg/kg 口服给药能显著地降低心电图的心肌缺血范围。统计方法同上。

表 3 白茛藜对狗冠脉结扎心表面电图 ST 段总和 (ΣST) 的影响 ($\bar{m}v$, $\bar{x} \pm S$, $n=5$)

| 组别 | 剂量 mg/kg | 指标 | 给药前 | | | | 给药后 (小时) | | |
|------|--------------|------------------------|---------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--|
| | | | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 3 | |
| 阴性对照 | NS 1ml/kg | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 164 \pm 44 | 166 \pm 62 1.2 \pm 28.0 | 188 \pm 80 12.5 \pm 36.0 | 173 \pm 75 2.2 \pm 25.4 | 171 \pm 71 2.3 \pm 28.4 | 164 \pm 50 1.2 \pm 22.8 | |
| 硝苯地平 | 5 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 285 \pm 122 | 206 \pm 38 -18.5 \pm 30.5 | 168 \pm 37 -34.5 \pm 21.5* | 142 \pm 52 -47.0 \pm 13.3** | 141 \pm 46 46.1 \pm 16.3** | 130 \pm 35 -50.5 \pm 13.2** | |
| 心脑舒通 | 100 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 179 \pm 59 | 160 \pm 67 -11.3 \pm 21.8 | 135 \pm 71 -26.2 \pm 22.6 | 138 \pm 75 -24.8 \pm 26.7 | 132 \pm 71 -27.7 \pm 25.8 | 110 \pm 59 -39.5 \pm 22.3* | |
| 白茛藜 | 10 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 158 \pm 60 | 160 \pm 73 -0.3 \pm 7.6 | 167 \pm 76 3.9 \pm 11.6 | 146 \pm 48 -5.7 \pm 14.8 | 136 \pm 57 -14.3 \pm 11.2 | 113 \pm 44 -26.0 \pm 21.4 | |
| | 20 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 202 \pm 63 | 161 \pm 89 -14.4 \pm 23.5 | 148 \pm 62 -18.5 \pm 16.6 | 142 \pm 48 -23.9 \pm 10.4 | 134 \pm 46 -27.5 \pm 9.5 | 112 \pm 38 -37.2 \pm 9.9* | |
| | 40 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 181 \pm 83 | 145 \pm 52 -30.6 \pm 15.4 | 137 \pm 43 -33.9 \pm 23.5 | 120 \pm 45 -39.4 \pm 21.2** | 111 \pm 44 -46.0 \pm 21.3* | 90 \pm 34 -59.7 \pm 17.7** | |

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, 与生理盐水组同时时间点的改变值比较。

表 4 白葵藜对冠脉结扎狗心电图心表面心电图心肌梗塞范围 (NST) 的影响 (点, $\bar{x} \pm S$, $n=5$)

| 组别 | 剂量 mg/kg | 指标 | 给药前 | | | 给药后 (小时) | | |
|------|-------------|------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | | | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 3 |
| 阴性对照 | 1ml/kg | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 24.6±2.1 | 23.6±2.6 -3.4±14.6 | 24.6±1.7 0.8±13.8 | 25.4±2.5 3.7±12.3 | 24.8±2.8 0.9±8.7 | 26.2±3.7 6.4±10.6 |
| 硝苯地平 | 5 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 29.0±1.2 | 27.6±0.9 -4.7±4.5 | 26.4±2.1 -8.9±7.0 | 25.0±3.5 -14.0±10.2* | 26.2±0.8 -9.6±2.6* | 26.2±2.0 -9.7±4.6* |
| 心脑舒通 | 100 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 24.6±2.3 | 24.8±3.1 1.2±13.1 | 22.4±4.4 -9.0±14.9 | 23.8±2.7 -2.7±13.0 | 24.0±3.2 -2.1±13.1 | 22.0±4.7 -10.9±14.2 |
| 白葵藜 | 10 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 25.2±3.3 | 25.8±2.3 3.3±12.2 | 25.0±3.1 -0.4±9.1 | 24.0±3.1 -4.0±11.8 | 23.4±2.1 -6.2±11.4 | 21.8±4.4 -12.9±16.6 |
| | 20 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 26.5±2.6 | 25.3±2.8 -2.7±3.3 | 24.3±2.9 -8.6±3.9 | 23.8±3.6 -9.7±5.0 | 24.5±3.9 -5.9±4.9 | 22.5±6.0 -7.9±3.8* |
| | 40 | $\bar{x} \pm S$ 变化% | 25.0±5.2 | 24.0±3.9 -9.3±8.6 | 24.3±4.3 -6.0±9.9 | 22.8±4.6 -12.9±21.3 | 21.8±3.9 -16.7±12.8 | 21.8±4.5 -24.2±20.3* |

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, 与生理盐水组同时时间点的改变值比较。

实施例 5

白蒺藜静脉注射急性毒性试验

名称：白蒺藜有效组分

配制：将白蒺藜有效组分精确称取 600mg，加蒸馏水至 40ml，然后按 1:0.8 分步稀释至所需浓度。

试验方法

将动物随机分组，每剂量组雌雄各 10 只动物，根据预实验结果，选定剂量范围为 122.88-300mg/kg，剂量间距为 1:0.8 等比设置。给药组按每 10kg 体重 0.2ml 体积静脉注射，对照组每只静脉注射同体积生理盐水。观察和记录方法同口服毒性试验。按 Bliss 法计算 LD_{50} 及 95%可信限。

试验结果

对照组动物静脉注射生理盐水 7 天无一例死亡。

给药组各动物的给药后缓慢出现少动，毛松，食欲差等症状，无惊厥发生。动物死亡较高剂量组多至 24 至 48 小时时间，有部分在 2-3 天内死亡，个别至第 5 天内死亡。死亡动物尸体解剖未见各脏器明显异常。存活动物在 3 天后恢复正常活动。各组存活动物至第 8 天解剖观察未见各主要脏器有明显异常变化。实验结果见表 5。

根据实验结果，白蒺藜有效组分对小鼠的静脉注射急性 LD_{50} (95%可信限) 雌雄两种性别分别未 187.73 (166.74-211.11) 和 204.41 (182.12-230.31) mg/kg。急性毒性没有性别差异。

表 5. 白蒺藜静脉注射小鼠死亡分布和 LD₅₀ 值

| 性别 | 剂量 mg/kg | 对数 剂量 | 动物 数 | 死亡动物分布 (天) | | | | | | | 死亡率 (%) | 死亡率 单位 | LD ₅₀ (95%可信限) mg/kg |
|----|-------------|----------|---------|------------|---|---|----|---|---|---|------------|-----------|------------------------------------|
| | | | | 4h | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| 雌 | 300.00 | 2.4771 | 10 | 0 | 0 | 0 | 8 | 2 | | | 10 | 100 | 7.4 |
| | 240.00 | 2.3802 | 10 | 0 | 1 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 8 | 80 | 5.84 |
| | 192.00 | 2.2833 | 10 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 5 | 50 | 187.73 |
| | 153.60 | 2.1864 | 10 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 30 | (166.74-211.11) |
| | 122.88 | 2.0895 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 2.60 |
| 雄 | 300.00 | 2.4771 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | | | | 10 | 100 | 7.40 |
| | 240.00 | 2.3802 | 10 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 70 | 5.52 |
| | 192.00 | 2.2833 | 10 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 30 | 204.41 |
| | 153.60 | 2.1864 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 20 | (182.12-230.31) |
| | 122.88 | 2.0895 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.60 |

说明书附图

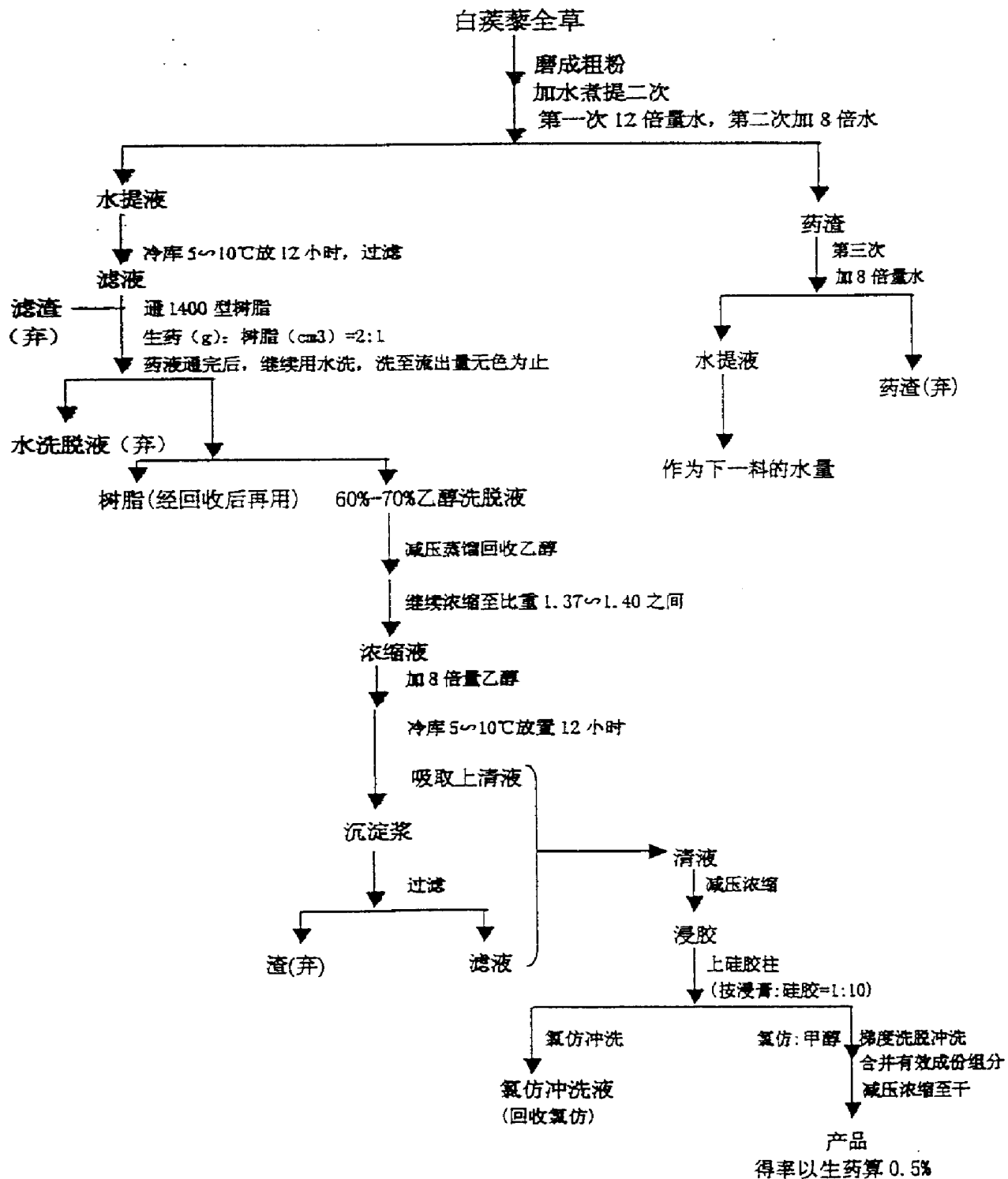


图 1